

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Nikolina Đorđić

Prediplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Faze mitoze stanica vršnog meristema korijena pšenice

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Nikolina Đorđić

Prediplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Faze mitoze stanica vršnog meristema korijena pšenice

Završni rad

Povjerenstvo za obranu i ocjenu završnog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. izv.prof.dr.sc. Andrijana Rebekić, član
3. prof.dr.sc. Sonja Vila, član

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku
Preddiplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo
Nikolina Đorđić

Završni rad

Faze mitoze stanica vršnog meristema korijena pšenice

Sažetak: Cilj ovog rada je determinirati faze mitoze u meristemu korijena kljanaca pšenice. U prvoj fazi istraživanja je bilo potrebno naklijati zrna pšenice. U drugoj fazi su metodom gnječenja napravljeni preparati stanica korijena pšenice. U trećoj fazi su pod mikroskopom određene faze mitoze i računao se mitotski indeks. Za mitotski indeks bilo je potrebno izbrojati 500 stanica te razlučiti stanice u interfazi od onih u nekoj od faza diobe. Detalji morfologije kromosoma nisu vidljivi zbog preskočenog tretmana fiksacije te razlika između interfaze i profaze nije bila dovoljno jasna. Samu vrijednost mitotskog indeksa dobivenu ovim istraživanjem zato ne treba uzeti u obzir.

Ključne riječi: mitoza, vršni meristem, metoda gnječenja, mitotski indeks

22 stranica, 2 tablica, 13 slika, 12 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production

BSc Thesis

Mitosis stages of root apical meristem of wheat

Summary: Purpose of this work is to determinate stages of mitosis in apical meristem of wheat. In first stage of research wheat seeds are placed to germinate. In second stage squash method is used to make cell section of wheat root. Third stage considered microscopic observing, assessment of stages in which cell is found and calculation of mitotic index. Morphologic details of chromosomes were not clearly visible and it was hard to distinguish difference between interphase and prophase. Value of mitotic index should not be considered as right.

Keywords: mitosis, apical meristem, squash method, mitotic index

22 pages, 2 tables, 13 pictures, 12 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical sciences in Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE.....	4
2.1. Biljni materijal	4
2.2. Mjere opreza u laboratoriju	5
2.3. Metoda gnječenja	6
2.3.1. <i>Naklijavanje sjemena</i>	6
2.3.2. <i>Hidroliza.....</i>	7
2.3.3. <i>Bojanje</i>	9
2.3.4. <i>Priprema preparata.....</i>	9
2.3.5. <i>Promatranje i dokumentacija</i>	10
3. REZULTATI I RASPRAVA	11
3.1. Slike pojedinih faza mitoze	13
3.2. Feulgenova metoda bojanja kromosoma	17
3.3. Fiksacija i predtretman biljnog materijala	18
3.4. Mitotski indeks	19
4. ZAKLJUČAK	21
5. LITERATURA	22

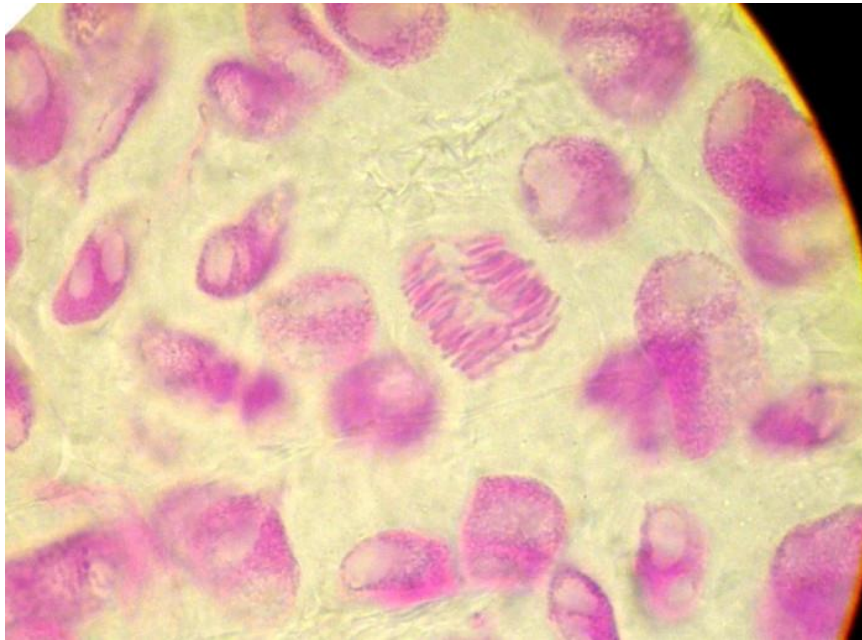
1. UVOD

Rudolf Virchov, njemački fiziolog, sažeo je saznanje o diobi stanica u latinskoj izreci „*Omnis cellula ex cellula*.“ – sve stanice nastaju iz postojećih stanica. Time je upotpunio staničnu teoriju o stanicama kao osnovnim gradivnim i funkcionalnim jedinicama svih živih bića. Upijanjem hraniva stanica raste i povećava svoj volumen brže nego površinu te stoga dolazi do potrebe za dijeljenjem. Ovaj rad pratit će upravo mitozu – diobu somatskih stanica sa citogenetičkog stajališta. Citogenetika je znanstvena disciplina koja proučava ponašanje kromosoma tijekom diobe stanica te načine nasljeđivanja na mikromolekularnoj razini. Barbara McClintock bila je pionirka u biljnim istraživanjima na polju citogenetike. Koristeći tehniku bojanja karminom uspjela je prikazati pojedinačne kromosome kukuruza (Figueroa i Bass, 2010.). Treba spomenuti i Schneidera koji prvi koristi tehniku bojanja i fiksacije pomoću samo jedne kemikalije tj. aceto – karmina. Ona predstavlja najjednostavniji način bojanja kromosoma. Kasnije tu metodu dodatno razvija John Belling te ju prilagođava samom istraživanju kromosoma. Rezultat Bellingove posvećenosti radu je knjiga *The Handling of chromosome* C.D Darlingtona i L. F La Coura, prvi put objavljena 1942. Ona sadrži sustavno i detaljno opisane materijale i metode koje služe istraživanju kromosoma.

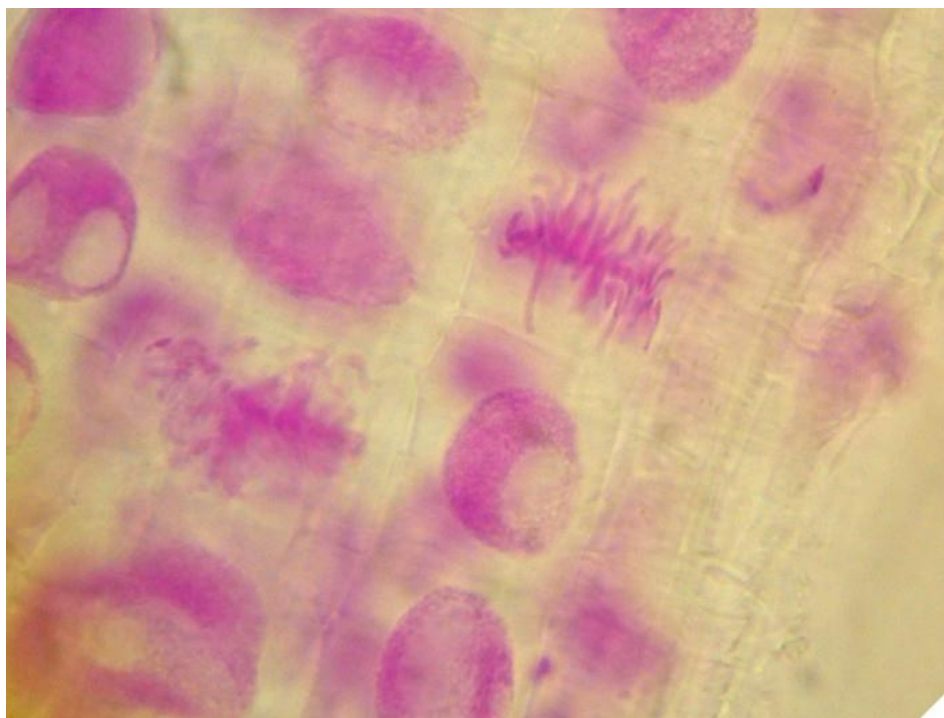
Mitoza se kod biljaka odvija u meristemskim tkivima u tzv. točkama rasta (vegetacijski vrh korijena, vegetacijski vrh stabljike...) (Bačić, 2003.). Na samoj staničnoj razini tijekom naklijavanja biljne stanice naizmjenično prolaze fazu DNA replikacije (S faza u kojoj dolazi do udvostučenja nasljedne tvari) i fazu podjele DNA (mitoza). Te dvije faze odvojene su međufazama. Razdoblje G_1 (1st gap) je razdoblje koje traje oko 11 sati. To je takozvano predsintetsko razdoblje u kojem dolazi do nakupljanja materijala za sintezu kromosoma. Razdoblje G_2 (2nd gap) je postsintetsko razdoblje kada se stanica priprema za diobu kromosoma i traje oko 4h. Faze G_1 , S, i G_2 zajednički nazivamo interfazom. Interfaza traje oko 90% ukupnog vremena staničnog ciklusa. Faze staničnog ciklusa očituju se u morfološkim promjenama. Rast same stanice odvija se kroz G_1 , S i G_2 . Udvostručenje jezgre tj. same nasljedne tvari događa se u S fazi, no najveće promjene citoplazme i jezgre zbivaju se tijekom mitoze i citokineze. (Denffer i Ziegler H, 1991.) Prilikom mitoze dolazi do nastanka stanice kćeri koja ima jednak broj kromosoma kao i stanica majka (Cohn, 1964.). Korijen pšenice (*Triticum aestivum* L.) će poslužiti kao izvor meristemskog tkiva. Predmet istraživanja ovog završnog rada ogledati će se u nekoliko faza. Važna

karakteristika meristemskih stanica je proliferacija tj. umnažanje te stoga prva faza ovog rada predstavlja naklijavanje zrna pšenice kako bi potakli intenzivnu diobu stanica i stvorili dovoljno meristemskog tkiva za ispitivanje. Druga faza istraživanja je metoda gnječenja (eng. *squash method*). Prethodi joj aplikacija raznih kemikalija i bojanje kromosoma. Tijekom predtretmana treba postići dobro razdvojene kromosome i što jasnije vidljive detalje morfologije kromosoma. Tako obrađen preparat može služiti proučavanju kariotipova i različitim mjerenjima. Upravo u trećoj fazi ovog istraživanja pod mikroskopom će se odrediti pojedine faze mitoze pa potom izračunati mitotski indeks (MI). Mitotski indeks predstavlja omjer broja stanica u diobi i ukupnog broja stanica. On je pokazatelj proliferacije stanica tj. brzine kojom se mitozom dijele stanice određene populacije. Već spomenuta pšenica, jedna od najznačajnijih ratarskih kultura i najrasprostranjenijih žitarica u svijetu je predmet ovog istraživanja i pokusa. Nakon provedenog pokusa na slici bi trebali vidjeti jedan sloj stanica čiji su se kromosomi obojali ljubičasto (Slika 1.). Stanice se razlikuju ovisno o položaju kromosoma u stanici odnosno fazi mitoze u kojoj se sami kromosomi nalaze kao primjerice na Slici 2. na kojoj raspoznamo metafazu.

Cilj ovog rada je provesti metodu gnječenja kojoj prethodi tretman odgovarajućim kemikalijama. Predtretman kemikalijama treba omekšati biljni materijal i učiniti ga pogodnim za samu metodu. Nakon uspješno provedene metode gnječenja pojedine faze mitoze bit će vidljive pod mikroskopom te će brojanje stanica u diobi i onih u mirovanju poslužiti izračunavanju vrijednosti mitotskog indeksa.



Slika 1. Kromosomi vršnog meristema korijena pšenice (Preuzeto sa fankhauserblog.wordpress.com)



Slika 2. Metafazni kromosomi pšenice raspoređeni na sredini stanice (Preuzeto sa fankhauserblog.wordpress.com)

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Pšenica je jedna od prvih kultiviranih biljaka uz ječam, zob i leguminoze. Koristi se u ljudskoj ishrani preko 10.000 godina. Prelaskom na sjedilački način života ljudi započinju sa odabrom sjemena najboljih biljaka za daljni uzgoj. Tim činom započinje umjetna selekcija pšenice. Pšenica pripada porodici *Poaceae/Gramineae* – trave u koju se ubrajaju još ječam, zob, raž i pšenoraž kao predstavnici strnih žitarica te kukuruz, proso, riža – prosolike žitarice. Unutar roda *Triticum* L. kojem pripada opisane su 22 vrste pšenice. Najvažniju klasifikaciju pšenice daje McKay 1988. godine. McKayova klasifikacija se temelji na razlici u genetskoj strukturi (Tablica 1.)

Prva skupina je diploidna skupina (*Monococcon*), druga je tetraploidna skupina (*Dicoccoidea*), a treća skupina je heksaploidna (*Speltoidea*).

Tablica 1. Podjela pšenice na osnovu genetske strukture prema McKeyu

	Diploidna skupina	Tetraploidna skupina	Heksaploidna skupina
Broj kromosoma	2n=14	2n=28	2n=42
Genom	A	AB	ABC

Zrno heksaploidne pšenice *Triticum aestivum* ssp. vulgare korišteno u ovom istraživanju je dobiveno je iz gen kolekcije Fakulteta agrobiotehničkih znanosti s Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo. Korištena je sorta Ilirija.

Zrno je stavljeno na naklijavanje u tri ponavljanja s razmakom od jednog dana kako bi osigurali dovoljno materijala za pokus te procijenili stupanj i jačinu mitoze ovisno o vremenskom razdoblju naklijavanja. Naklijavanjem zrna pšenice tj. aktivacijom enzima i razgradnjom rezervnih tvari uslijed upijanja vode, sjemena ljuska tzv. sjemenjača puca te se kroz nju probija primarni korjenčić. Korjenčić raste i proizvodi tvorno tj. meristemsko tkivo čije stanice zadržavaju sposobnost diobe tijekom cijelog života.

Radi se o embrionalnom tipu stanica koje se množe kako bi održavale samo meristemsko tkivo te stvarale tkiva i organe kroz životni ciklus biljaka. Meristemsko tkivo usmjerava

svoju aktivnost kao odgovor na abiotske i biotske čimbenike što osigurava biljci razvoj unutar prevladavajućih uvjeta.

2.2. Mjere opreza u laboratoriju

Ukratko ćemo se upoznati sa najvažnijim mjerama opreza u laboratoriju. Obavezno je nošenje zaštitnih rukavica i mantila pri rukovanju sa kemikalijama i laboratorijskim priborom. Vezanje duge kose te skidanje nakita spriječiti će moguće neželjene pojave. Unos hrane i pića u laboratorij je zabranjen kao i pušenje. Važno je oprati ruke nakon laboratorijskih aktivnosti i na kraju posebno treba istaknuti važnost odgovornog ponašanja prema laboratorijskom posuđu, opremi i kemikalijama s kojima rukujemo. U Tablici 2. naveden je korišteni laboratorijski pribor i kemikalije prilikom provođenja pokusa.

Tablica 2. Laboratorijski pribor i kemikalije

LABORATORIJSKI PRIBOR	KEMIČALIJE
Petrijeve zdjelice	1 M HCl
Filter papir	Schiffov reagens
Eppendorf epruvete	45 % octena kiselina
Kapaljka	70 % etanol
Pinceta	
Predmetnice i pokrovnice	
Laboratorijski štapić i igla	
Škare	

2.3. Metoda gnječenja

U nedostatku neke opreme i kemikalija na našem fakultetu priprema samog preparata izvedena je na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

Osnovni koraci prilikom pripreme preparata metodom gnječenja su sljedeći:

1. Naklijavanje sjemena u svrhu stvaranja meristenskog tkiva za proučavanje
2. Izdvajanje vrha korijena (oko 1 cm duljine)
3. Hidroliza vrha korijena u klorovodičnoj kiselini pri temperaturi od 60°C
4. Bojanje kromosoma u vršnom meristemu korijena Feulgenovom metodom
5. Usitnjavanje obojenog tkiva i priprema preparata gnječenjem
6. Promatranje mikroskopom i dokumentacija rezultata

2.3.1. Naklijavanje sjemena

U svaku od tri Petrijevu zdjelicu sa filter papirom jednoliko je raspoređeno 10 zrna pšenice (Slika 3.). Papir je zatim namočen vodom do zasićenja i zdjelica je zatvorena. Ukoliko se papir isuši tijekom naklijavanja treba ga dodatno namočiti. Prva Petrijeva zdjelica sadržavala je zrno koje će klijati četiri dana. Sljedeći dan je u drugu Petrijevu zdjelicu stavljeno zrno koje će klijati tri dana, a trećeg dana u treću zdjelicu zrno koje će klijati dva dana. Zrno je klijalo na sobnoj temperaturi koja je u prosjeku bila 20°C.

Sjeme 1. : 28. lipnja, trajanje klijanja 4 dana

Sjeme 2. : 29. lipnja, trajanje klijanja 3 dana

Sjeme 3. : 30. lipnja, trajanje klijanja 2 dana



Slika 3. Biljni materijal u petrijevim zdjelicama (Foto original: Đorđić N.)

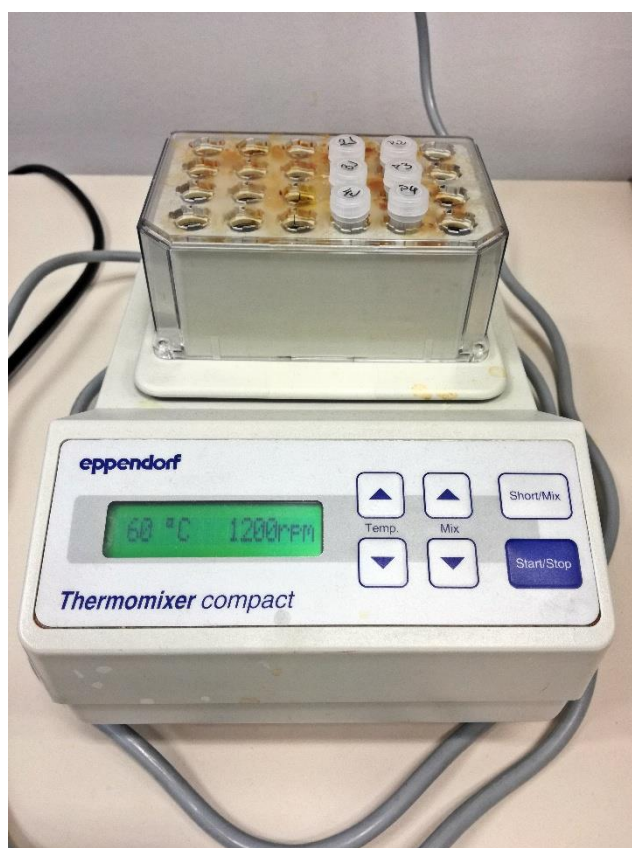
Nakon 4 dana naklijavanja zrna, vršni dio korijena koji sadrži meristemsko tkivo je izdvojen. Otprilike 1 centimetar duljine vrha korijena odrezano je škarama i pomoću pincete stavljeno u čistu Eppendorf epruvetu. Eppendorf epruvete u koje je stavljen materijal označe se markerom na odgovarajući način kako ne bi došlo do miješanja materijala.

2.3.2. Hidroliza

U sljedećem je koraku u Eppendorf epruvetu sa biljnim materijalom dodana 1 molarna klorovodična kiselina (Slika 4.). Kapaljkom je dodano tek toliko kiseline da svi korijenčići budu potpuno uronjeni. Epruvete su zatim stavljene na termičku obradu u termomikser (Slika 5.). Termičkoj obradi jednako dobro može poslužiti i parna kupelj. Korijenje je tretirano 20 minuta na 60°C kako bi tkivo omekšalo i kako bi time olakšali pripremu preparata.



Slika 4. Biljni materijal i klorovodična kislina u Eppendorf epruветama (Foto original: Đorđić N.)



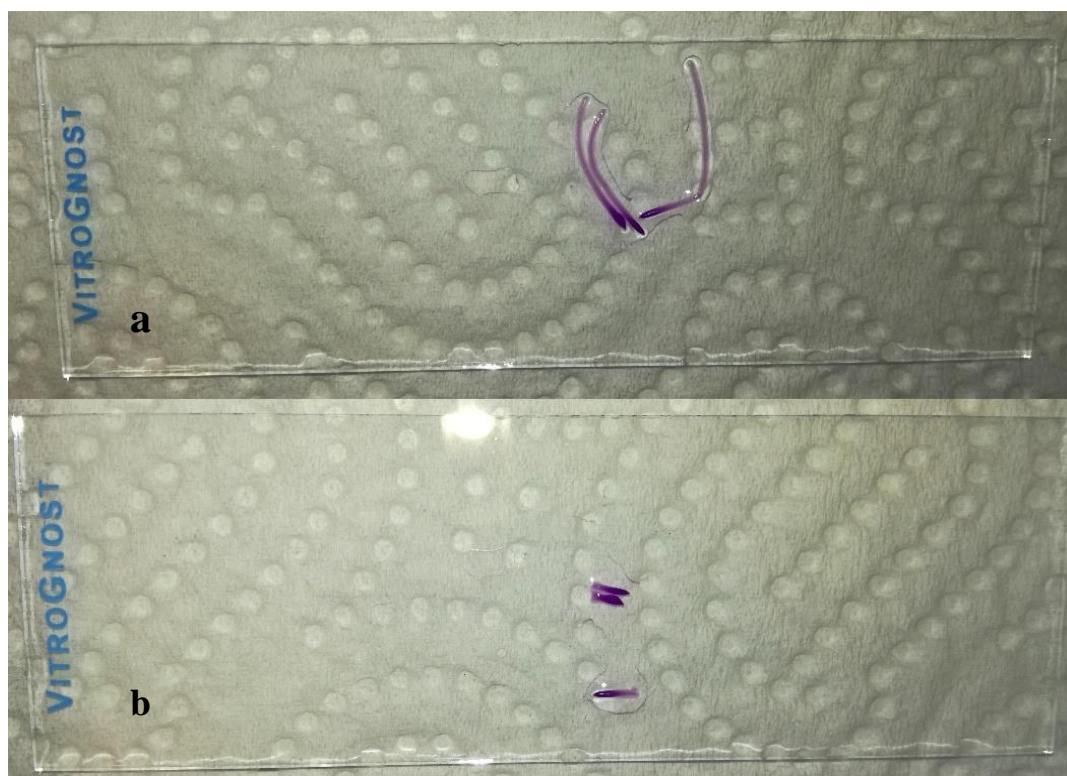
Slika 5. Termička obrada biljnog materijala u termomikseru (Foto original: Đorđić N.)

2.3.3. Bojanje

Nakon hidrolize uslijedilo je bojanje. Prvo je iz Eppendorf epruvete kapaljkom odstranjena klorovodična kiselina. Zatim je dodana destilirana voda kako bi korijenje dobro isprali od kiseline. Destilirana voda je potom odstranjena te je u epruvetu čistom kapaljkom dodan Schiffov reagens. Epruveta je pohranjena u mračnu prostoriju na 20 minuta. Nakon 20 minuta bojanja korijenja obojenje se pokazalo u vidu tamno ljubičaste boje.

2.3.4. Priprema preparata

Iz Eppendorf epruvete je pincetom izvučeno nekoliko korijenčića. Korijenčići su položeni na predmetno stakalce. Na Slici 6a. jasno se vidi najjače obojenje u vrhu korijena gdje su meristemske stanice. Vršni dio korijena koji se jače obojao duljine oko 1 – 2 mm (Slika 6b.) je zatim izdvojen pomoću pincete i laboratorijske igle.



Slika 6 (a/b). Korijenje obojano Feulgenovom bojom (Foto original: Đorđić N.)

Na vršak korijena je stavljena kap 45% octene kiseline. Zatim slijedi usitnjavanje biljnog materijala pomoću laboratorijskog štapića. Udarci štapićem trebaju biti okomiti na površinu te ne prejak kako nebi razbili predmetnicu. Preko dobro usitnjenog biljnog

materijala položeno je pokrovno stakalce. Pokrovno stakalce treba oprezno spuštati na preparat kako bi se izbjeglo stvaranje mjehurića zraka. Trakice filter papira polože se preko stakalca. U sljedećem se koraku izvrši pritisak preko filter papira pritom pazeći da pokrovnica ne pukne. Pritisak se vrši jagodicom palca strogo okomito pritom ne podižući prst sa stakalca. Preparat se može nekoliko puta provući kroz plamenik kako bi se dobio još tanji preparat te se i sam pritisak na stakalce može još ponoviti. Ovako pripremljen preparat spreman je za mikroskopiranje.

2.3.5. Promatranje i dokumentacija

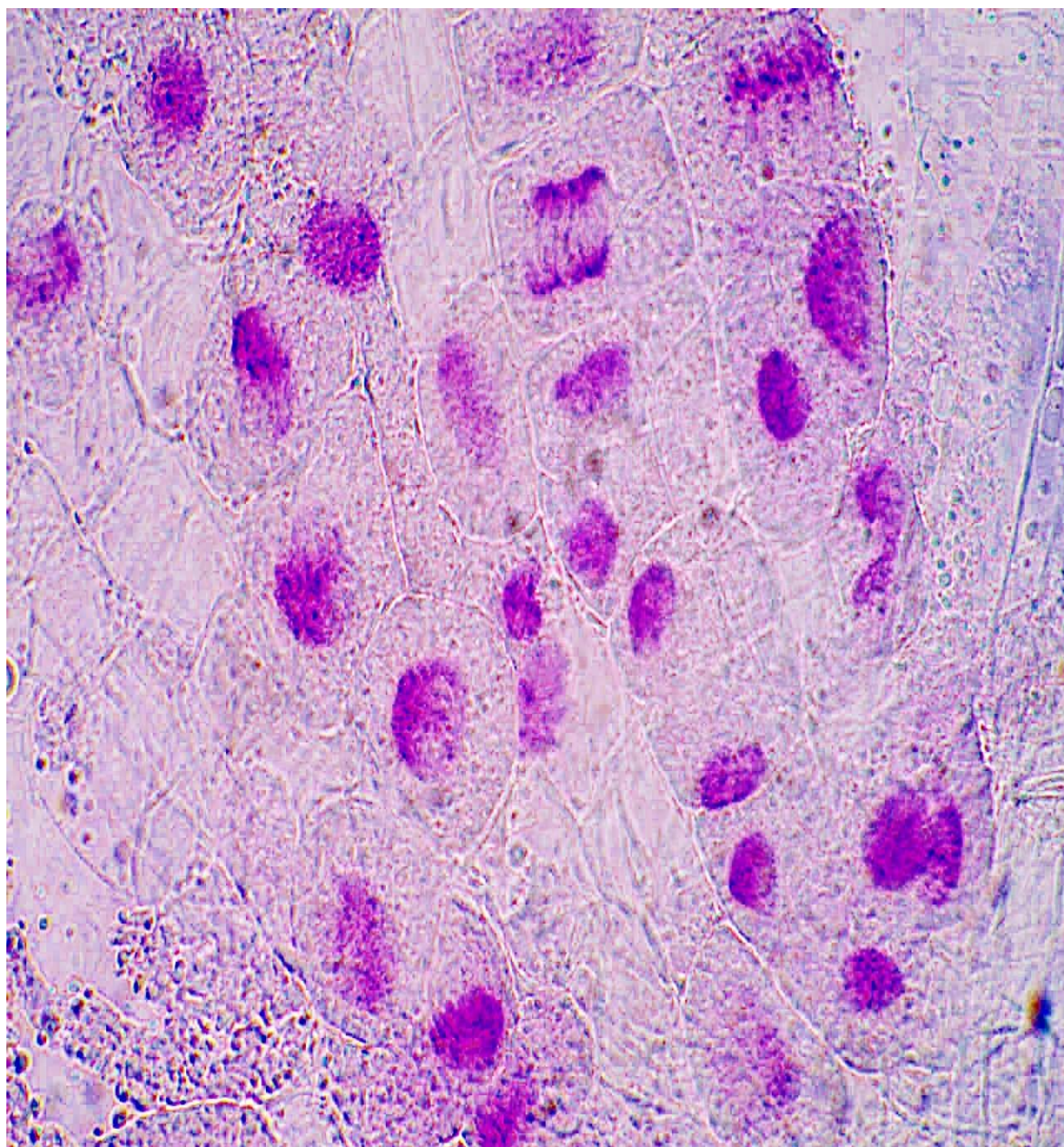
Za potrebe mikroskopiranja korišten je Stereozoom mikroskop s kamerom Olympus XZ 200, s Odjela za biologiju Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku. Uz pomoć kamere spojene na mikroskop te softvera instaliranog na računalo s kojim je mikroskop također spojen, uslikane su pojedine faze mitoze – profaza, metafaza, anafaza i telofaza. Slike su zabilježene pod povećanjem od 1000 puta. Također su izbrojane stanice u svrhu računanja mitotskog indeksa.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Za ovaj je pokus bio potreban vršni dio korijena pšenice. Stoga je sjeme 4 i 3 odbačeno za daljnja istraživanja mitoze i mitotskog indeksa. Uslijed dužeg vremena klijanja došlo je do formiranja klicinog stabalca, tj. sjemenka je počela trošiti energiju na stvaranje vršnog izdanka (Bačić, 2003.). To za posljedicu ima manju energiju za rast korijenčića, a time i manju mitotsku aktivnost u tom području. Biljno tkivo treba biti što mlađe tj. upotrijebljeno u trenu kada se energija sjemena još nije počela dijeliti trošeći se na rast vršnog izdanka. 10 sjemenki koje je klijalo 2 dana predstavljalo je dovoljnu količinu materijala za bojanje. Za potrebe naklijavanja su korištene tri Petrijeve zdjelice sa filter papirom. Glavni činitelji klijanja su voda, temperatura i kisik. Optimalna temperatura za klijanje sjemenki pšenice je od 12 – 20 °C, a temperature iznad 24°C mogu izazvati pojavu patogena koji mogu uništiti klicu. U pokusu je korištena destilirana voda kako bi izbjegli moguće kontaminacije vodom iz vodovoda. Dobro je proizvesti što više biljnog materijala za pokus jer se on kvalitetno može skladištiti na duže vrijeme u 70% etanolu pri temperaturi od 4°C. Na taj način smo osigurali dovoljno materijala za ponavljanje procesa pripreme idealnog preparata za mikroskopiranje, ali i prilagodbu samog procesa biljnoj vrsti te cilju proučavanja. Štedimo i vrijeme koje bi bilo potrebno za ponovno naklijavanje.

Pri rukovanju sa klorovodičnom kiselinom (HCl) tijekom hidrolize treba biti oprezan. HCl je jaka kiselina i stoga treba koristiti zaštitne rukavice. Prilikom hidrolize purinske se baze otcjepljuju od deoksiriboze time oslobađajući aldehidne skupine na DNA lancu. Tako je omogućeno vezanje boje na DNA materijal i samo obojenje. Ova pojava se temelji na takozvanoj Feulgenovoj reakciji. Schiffov reagens je bezbojna tekućina. Skladišti se u tamnoj boci koja joj produžuje vijek trajanja. Bazični fuksin sastojak je ove boje. Kromosomi su po prirodi kiseli pa zato boje koje se koriste za bojanje kromosoma moraju biti bazične. Izdvajanjem najjače obojenog dijela korijena dobijamo materijal za izradu preparata gnječenjem. Potrebna je vještina u ovom koraku kako bi napravili što tanji preparat. Poželjno je dobiti samo jedan sloj stanica. Prilikom pritiska treba pripaziti da ne dođe do horizontalnog pomicanja pokrovnog stakalca. Pritisak treba biti izvršen strogo okomito. Treba biti oprezan kako staklo ne bi puklo. Obojenje korijena pšenice je posebno izraženo u vršnom dijelu korijena jer je tamo najviše genetskog materijala tj. najveća je aktivnost meristemskih stanica koje se dijele.

Nakon provedene metode gnječenja mikroskopiranjem je potvrđeno uspješno obojenje kromosoma Schiffovim reagensom (Slika 7.). Napravljena su dva preparata za potrebe mikroskopiranja. Na preparatu su pronađene skupine stanica koje su bile najbolje vidljive te je tako izbrojano 500 stanica za izračun mitotskog indeksa.

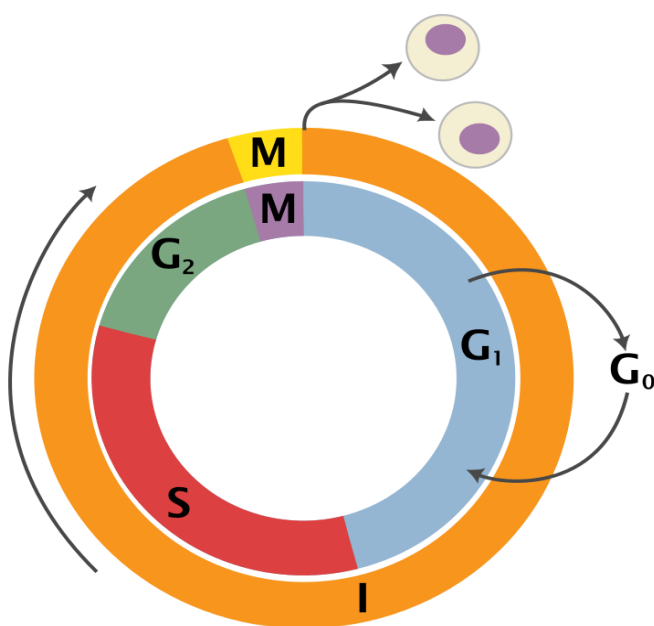


Slika 7. Izgled preparata pod mikroskopom

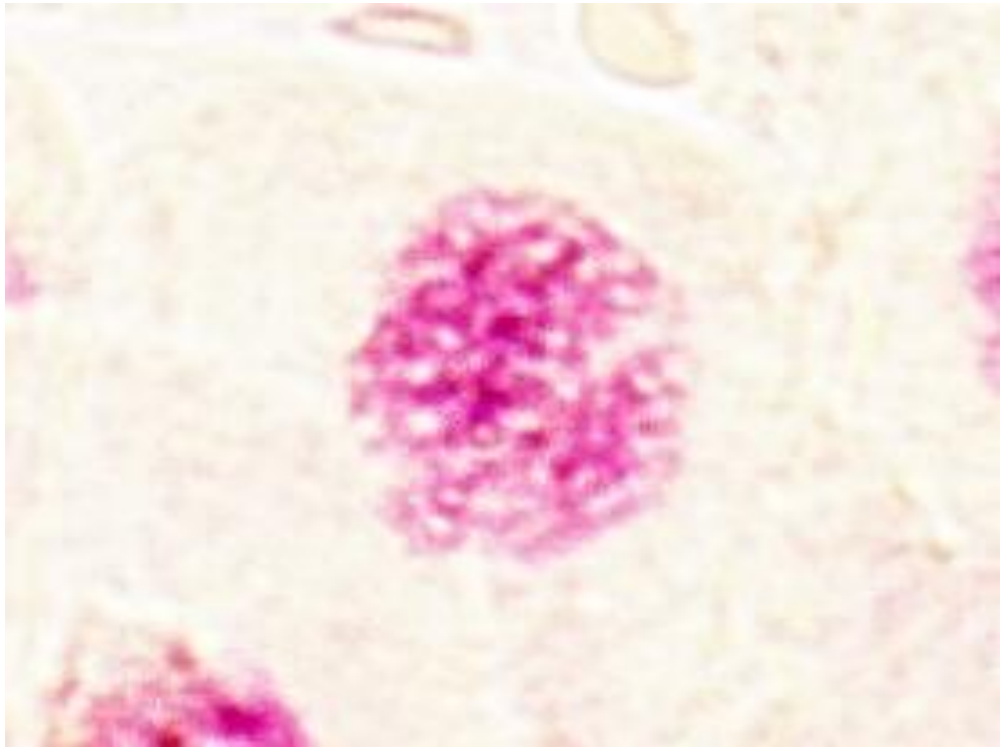
3.1. Slike pojedinih faza mitoze

Zbog ne tako jasno vidljive morfologije kromosoma nakon fotografiranja mikroskopom i zbog vjernijeg predodžanja pojedine faze mitoze slike su dodatno obrađene i izoštrene pomoću Photoscape programa.

Stanični ciklus sastoji se od interfaze i mitoze. Mitozu dijelimo na profazu, metafazu, anafazu i telofazu, čime završava kariokineza, nakon čega slijedi dijeljenje citoplazme odnosno citokineza. Interfaza se naziva još i faza mirovanja iako je jezgra stanice vrlo aktivna. Jezgra sadržava kromatin.. Sastavom je kromatin isti kao i kromosomi no drukčijeg pojavnog oblika. To je oblik u kojem se kromosomi nalaze u interfazi. Kromosomi su vrlo isprepleteni i ne mogu se razlučiti. U interfazi se odvija udvostučenje nasljednog materijala tj. dolazi do replikacije i transkripcije DNA kako bi se onda tijekom same mitoze biljni materijal podijelio i kako bi nastale identične stanice, stanice kćeri. Interfaza predstavlja pripremu stanice za mitozu. Već je spomenuto kako se ona sastoji od 3 faze: G_1 , S i G_2 i traje oko 90% ukupnog vremena staničnog ciklusa.



Slika 8. Shematski prikaz staničnog ciklusa (Preuzeto sa www.wikipedia.org.)

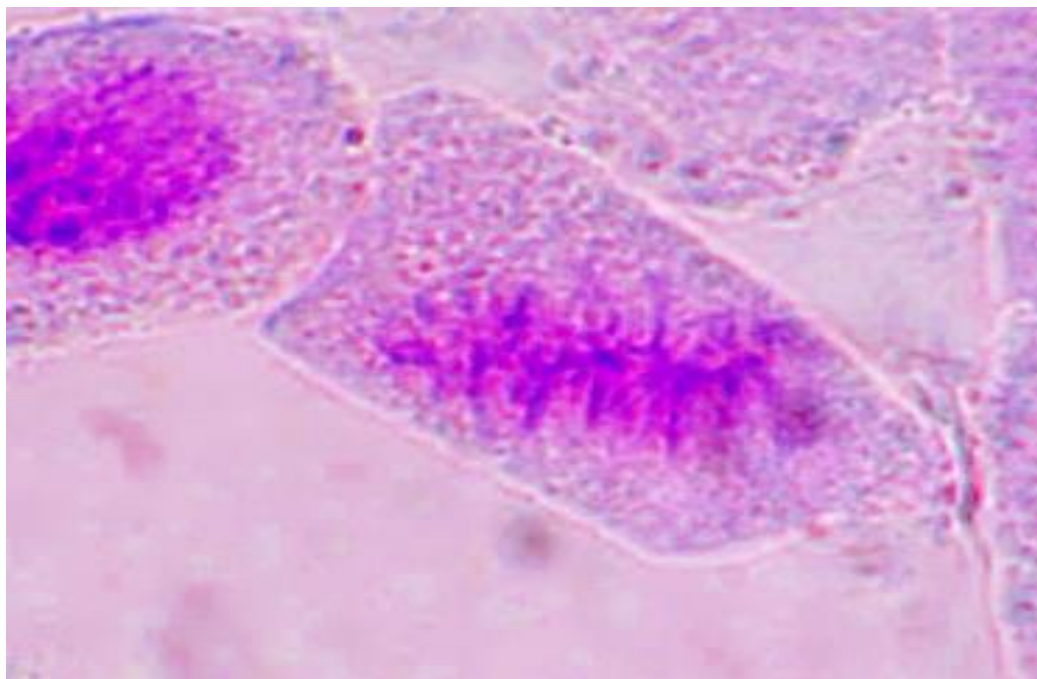


Slika 9. Profaza (Foto original: Đorđić N.)

Slika 9. prikazuje stanicu u profazi. U profazi dolazi do razgradnje jezgrine membrane i jezgrice. Razgradnjom jezgrice dolazi do prestanka proizvodnje ribosoma. Stanica sad usmjerava svoju energiju na dijeljenje (Singh, 2016.)

Kromatinske niti se skraćuju procesom spiralizacije DNA i dvije sestrinske kromatide postaju vidljive. Kromatide su spojene u zajedničkoj centromeri. One su osnova za daljnu diobu nasljednog materijala. Kako profaza odmiče tako su kromosomi sve bolje vidljivi odnosno jače se kondenziraju.

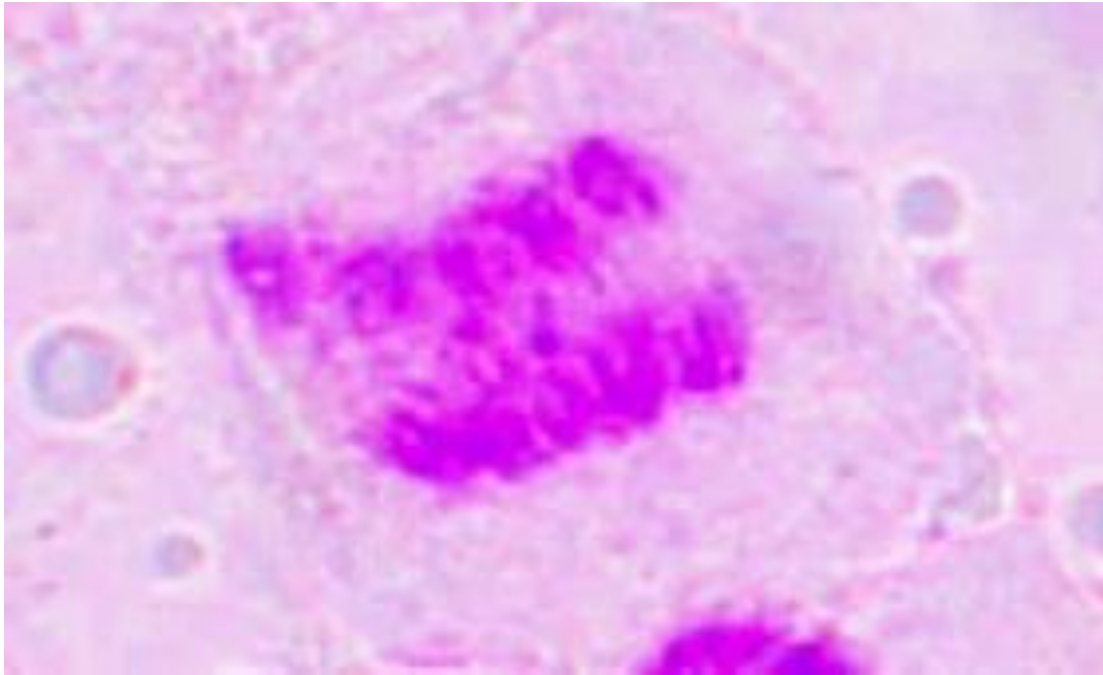
Tijekom profaze dolazi do nastanka diobenog vretena. Niti diobenog vretena će povući po jednu kromatidu na svaki kraj stanice kada za to dođe vrijeme.



Slika 10. Metafaza (Foto original: Đorđić N.).

Slika 10. prikazuje stanicu u metafazi. Kromosomi se sada nalaze u središtu stanice. Kromatide se spajaju sa nitima diobenog vretena u kinetohorama. Kinetohore pak služe orijentaciji kromosoma tako da kromatide jednog kromosoma završe na suprotnim polovima stanice i dođe do jednake podjele genetskog materijala. Zbog centralnog položaja i orijentacije kromosoma u metafazi te činjenice da su u metafazi maksimalno spiralizirani, kromosomi se ovdje mogu najjasnije razlučiti.

Metafazni kromosomi se koriste u istraživanju kariotipa organizma, pri čemu možemo odrediti njihovu građu, položaj centromere i moguće strukturne promjene.

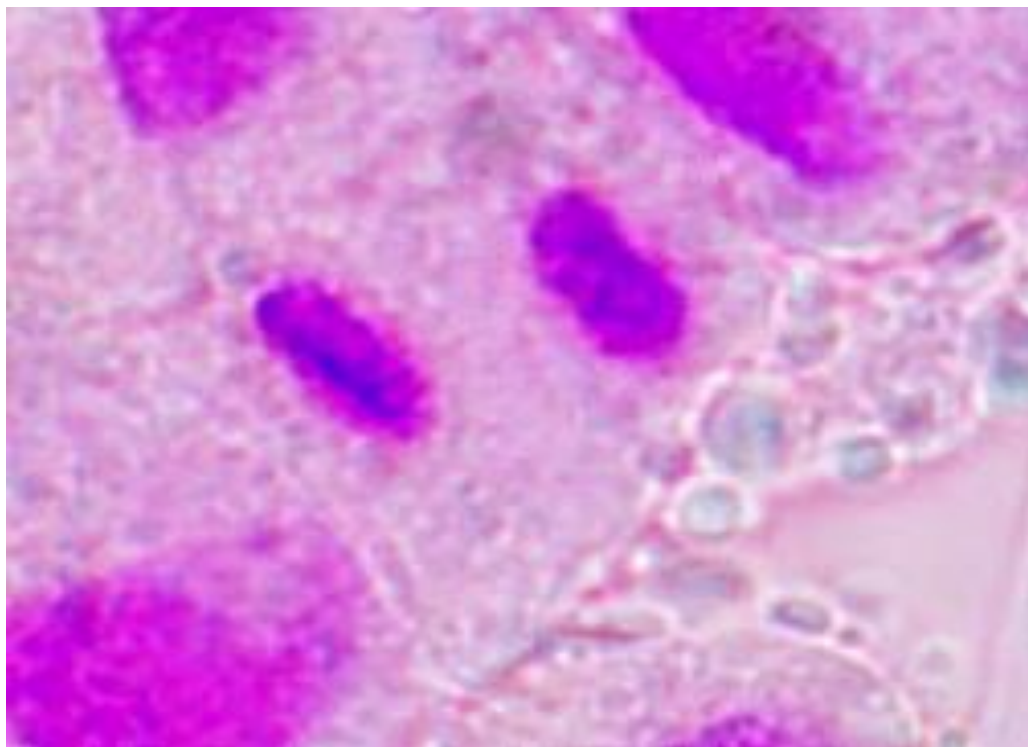


Slika 11. Anafaza (Foto original: Đorđić N.)

Slika 11. prikazuje stanicu u anafazi. Nju karakterizira podjela kromosoma na dvije kromatide. Niti diobenog vretena vuku po jednu kromatidu svakog kromosoma na jedan kraj stanice (Cohn, 1964.). Svaka kromatida predstavlja cjelovit kromosom tj. sadržava cijelu genetičku uputu potrebnu jednoj stanici. Na kraju anafaze nestaje diobeno vreteno i genetski materijal je jednako raspoređen na polovima stanice.

Anafaza je ključna u mitozu jer upravo ona određuje jednak broj, diploidni broj, kromosoma te identičan genetski materijal u obje stanice koje će nastati nakon telofaze.

U istraživanju je ispitivana heksaploidna pšenica Ilirija koja ima $2n=42$.



Slika 12. Telofaza (Foto original: Đorđić N.)

Slika 12. prikazuje stanicu u telofazi. To je završna faza. Nasljedni materijal jednako je raspoređen na krajevima stanice. Dolazi do despiraliziranja kromosoma tj. ponovnog zgušnjavanja nasljednje tvari u kromatin. Stanica sada može započeti citokinezu tj. podjelu citoplazme i ostalih staničnih organela te stvaranje stanične stijenke. Time završava stanični ciklus i stanica će se ponovno naći u interfazi.

3.2. Feulgenova metoda bojanja kromosoma

Za identifikaciju DNA još prije 100 godina je predložena Feulgenova metoda. Za otkriće su zaslužni Robert Feulgen i Heinrich Rossenbeck koji su ju otkrili još davne 1924. (Mello, 2017.). Sastoji se od dva koraka: hidrolize u kiselini i tretmana Schiffovim reagensom. Prilikom hidrolize treba optimizirati dva glavna čimbenika reakcije. To su koncentracija korištene kiseline i temperatura pri kojoj se tretman provodi. Hidroliza koja je obavljena prije bojanja imala je za ulogu omekšavanje tkiva korijena zbog lakše pripreme preparata. Prvotno je materijal stavljen na hidrolizu u termomikser na 10 minuta, no zatim je vrijeme produženo za još 10 minuta jer je korijen pšenice i dalje bio dosta tvrd. Tvrdoća je povezana sa središnjom lamelom stanice od kalcijeva i magnezijeva pektinata koja osigurava stabilnost biljkama.

Hidroliza ima još jednu ulogu. Prilikom hidrolize purinske se baze (adenin i gvanin) otcjepljuju od DNA molekule. Time se oslobađaju aldehidne skupine na lancu DNA. Schiffov reagens se zatim veže na aldehid i dolazi do ljubičasto – crvenog obojenja. Bazični fuksin glavni je sastojak ove boje. (Sharma i Sharma, 1980.), a samo obojenje temelji se na tzv. Feulgenovoj nukleinskoj reakciji. Već je istaknuto kako su kromosomi kiseli po prirodi pa se stoga bojaju bazičnim bojama. Bez hidrolize ova reakcija ne bi bila ostvariva.

Schiffov reagens je bezbojna otopina koja se spaja s aldehidima i ketonima što rezultira obojenjem. Reakcija dokazivanja prisutnosti aldehida i ketona naziva se Schiffova reakcija. Zasluge za njezino otkriće idu Hugu Schiffu prema kojem je dobila ime. Schiffov reagens sadrži ljubičasti fuksin i stoga bi otopina trebala biti ljubičasta no dekolorizirana je u sumpornom kiselinom u procesu pravljenja. Prisutnost aldehida ili ketona aktivira boju. Slike koje smo dobili nakon bojanja Schiffovim reagensom nisu tako jasne. Moguće je da vrijeme hidrolize previše produljeno ili pak nije trebalo preskočiti fiksaciju materijala.

3.3. Fiksacija i predtretman biljnog materijala

Proces fiksacije je nužan ako želimo bolje istražiti samu strukturu i položaj kromosoma. Kao fiksatori najčešće se koriste alkoholi i kiseline. Etanol je često korišten u kombinaciji sa octenom kiselinom. Octena kiselina često se koristi kao sastojak fiksativa, ali zbog nje kromosomi mijenjaju svoju morfologiju. Dolazi do oticanja tj. bubrenja samih kromosoma. Zato se ona ne preporuča kao sastojak fiksativa ako su cilj istraživanja morfološki detalji samih kromosoma. Alkohol u fiksativu djeluje na biljno tkivo tako da uzrokuje skupljanje tkiva tj. protoplazme. U fiksativu u kojem je pomiješan utjecaj octene kiseline i etanola skupljanje tkiva te bubrenje kromosoma su izbalansirani.

Nakon tretmana Schiffovim reagensom fiksirani kromosomi bili bi jasnije vidljivi. Bez fiksacije teže je raspoznati pojedine faze mitoze. Najveća poteškoća je u razlikovanju interfaze i profaze, tj. razlikovanju stanice u mirovanju i stanice čiji su se kromosomi počeli kondenzirati. Zbog toga je pri brojanju stanica u svrhu računanja mitotskog indeksa nenamjerno došlo do pogreške. Primjerice, neka stanica je determinirana kao stanica u mirovanju no zapravo je DNA materijal počeo kondenzirati što predstavlja ranu profazu te stanice. Na načinjenim preparatima gnječenjem je uspješno dobijen jedan sloj stanica što je uvelike olakšalo raspoznavanje.

Pšenica ima vrlo velik genom stoga je vidljivost pojedinačnih kromosoma otežana. Kako bi dobili bolju sliku metafaznih kromosoma mogu se napraviti razni predtretmani. Predtretman se može izvršiti vrlo jednostavno – tretiranjem biljnog materijala hladnom vodom ili na nešto teži i opasniji način tretmanom kolhicinom. Kolhicin je otrovni alkaloid izoliran iz biljke mrazovac (*Colchicum autumnale*). Poznat je kao citostatik i oprezno se koristi u liječenju nekih bolesti. Zaustavlja stanični ciklus, sprječava formiranje diobenog vretena čime su kromosomi lijepo raspoređeni po stanici. To ih čini pogodnim za istraživanje njihove morfologije, oblika i izrade kariotipa.

3.4. Mitotski indeks

Stanice za potrebe izračuna mitotskog indeksa brojane su na dijelovima dvaju preparata koji su bili najjasnije vidljivi. Brojano je ukupno 500 stanica. Uz pomoć formule za izračun mitotskog indeksa dobijena je sljedeća vrijednost.

$$MI = \frac{\text{broj stanica u mitozu}}{\text{ukupan broj stanica}}$$

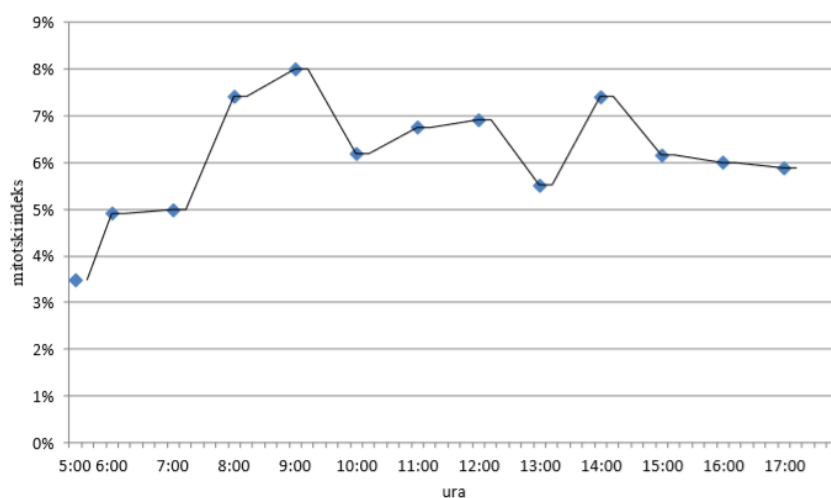
$$MI = \frac{79}{500} = 0,158$$

Množeći vrijednost mitotskog indeksa sa 100 dobijamo postotak stanica u diobi. On u ovom slučaju iznosi 15,8%. Zbog već spomenutih poteškoća u razlikovanju interfaze od profaze ove rezultate treba odbaciti.

Kada pokus za cilj ima izračunavanje i tumačenje vrijednosti mitotskog indeksa biljni materijal se izlaže različitim uvjetima prilikom naklijavanja. Prvi primjer je primjena različitih kemijskih agensa koji potiču ili inhibiraju mitozu. Tako je primjerice autorica Melnjak (2009.) u svom diplomskom radu testirala utjecaj teškog metala talija koji toksično djeluje na žive organizme. Cilj rada je bio ispitati utjecaj talija na meristemske stanice korijena boba (*Vicia faba* L.) i luka (*Allium cepa* L.). Autorica Melnjak je računala mitotsku aktivnost te pratila pojavu kromosomskih aberacija. Za pripremu preparata također je koristila metodu gnječenja. Rezultati njezina istraživanja su pokazali kako talij inhibira tj. onemogućava normalan rast korijena, a na staničnoj razini taj učinak je vidljiv

iz vrijednosti mitotskog indeksa. Zaključila je kako se povećavanjem količine talija povećava i inhibicija diobe kod luka i boba. Na brzinu mitoze utječe temperatura, količina svjetlosti kojoj je sjeme izloženo tijekom naklijavanja pa i samo trajanje naklijavanja. U ovom radu je sjeme koje je klijalo 3 i 4 dana odbačeno za daljna istraživanja jer je klica već počela formirati klicino stabalce. Energija klijanja se podijelila na vršni i korijenov meristem. Korijenje koje je duže klijalo zasigurno bi pokazalo manju vrijednost mitotskog indeksa.

Jagodič (2014.) je u svom pokusu ispitivala razlike u mitotskom indeksu boba (*Vicia faba* L.) ovisno o dobu dana, tj. ovisno o intenzitetu svjetlosti. Također je ispitivala mitotski indeks ovisno o dužini korijena tj. trajanju naklijavanja. Najveća je vrijednost izmjerena u 8, 9 i 14 sati zbog najvećeg intenziteta svjetlosti u to doba dana. Zaključila je i da je veća mitotska aktivnost kod kraćeg korijenja. Intenzitet mitoze se smanjuje produljenjem korijena. Autorica Jagodič iznosi i podatak o optimalnoj duljini korijena koja je 1 – 2,5 cm (Slika 13).



Slika 13. Prosječan mitotski indeks korijena boba ovisan o dobu dana (Preuzeto od Jagodič E.)

4. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada djelomično je zadovoljen. Provođenjem hidrolize biljni materijal je omekšan i time je omogućeno izvođenje gnječenja u svrhu izrade preparata. Prilikom provođenja hidrolize u klorovodičnoj kiselini treba optimizirati trajanje tretmana tj. prilagoditi ga istraživanom biljnom materijalu ovisno o njegovoj tvrdoći. Nakon hidrolize kromosomi su se uspješno obojali. Zbog svoje kisele prirode kromosomi su na sebe vezali bazičnu boju i obojali se ljubičasto. Vezanje boje je također omogućeno tretmanom u klorovodičnoj kiselini. Na izrađenim preparatima pronađene su stanice u svim fazama mitoze.

Zbog preskočenog tretmana fiksacije morfologija kromosoma nije jasno izražena i nije moguće jasno razlikovati stanicu u nekoj od faza diobe od stanice u interfazi. Dakle, preskočimo li tretman fiksacije biljni materijal neće biti prikladan za brojanje stanica i izračun mitotskog indeksa niti za proučavanje same morfologije i strukture kromosoma. U daljnim istraživanjima plan je provesti fiksaciju prije bojanja. U tom smjeru treba teći optimizacija pokusa.

Prilikom izvedbe metode gnječenja treba biti oprezan kako pokrovnica ne bi pukla. Također treba pripaziti da ne dođe do horizontalnog pomicanja pokrovnog stakalca. Važno je dobiti što tanji preparat tj. jedan sloj stanica što samo brojenje stanica čini lakšim. Ova metoda se može modificirati na različite načine ovisno o samom biljnom materijalu te predmetu istraživanja.

5. POPIS LITERATURE

1. Bačić T. (2003.): Morfologija i anatomija bilja. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 269
2. Cohn N. S. (1964.): Elements of cytology. Harcourt, Brace & World, Inc., New York, 495
3. Darlington C.D., La Cour L. F. (1942.): Handling of chromosome, George Allen & Unwin Ltd, London, 180
4. Denffer D., Ziegler H. (1991.): Botanika – morfologija i fiziologija, Školska Knjiga, Zagreb, 595
5. Figueroa D. M., Bass H. W. (2010.): A historical and modern perspective of plant cytogenetics. Briefings in functional genomics, vol 9. (no 2): 95-102
6. Kovačević, V., Rastija, M. (2009.): Osnove proizvodnje žitarica - interna skripta, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
7. Melnjak, A.: Genotoksičan učinak talijeva (I) acetata na meristemske stanice boba (*Vicia faba* L.) i luka (*Allium cepa* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb, (2009.)
8. Ostergren G., Heneen W. K. (1962.): A squash technique for chromosome morphological studies. Hereditas, vol 48: 332-341
9. Singh R. J.: Practical manual on plant cytogenetics (2018.), Taylor and Francis Group LLC, Boca Raton, 313
10. Jagodič E.: Dnevne spremembe mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečih semen boba (*Vicia faba* L.). Diplomski rad, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, (2014.)

INTERNET

11. Mello, M.L.S.: The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives, Acta Histochemica (2017.)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>
12. Sharma A. K., Sharma A.: Chromosome techniques: Theory and practice, Third edition (1980.)
[https://books.google.hr/books?id=GJf3AgAAQBAJ&dq=sharma+theory+and+practice+third+edition&lr=&hl=hr&source=gbs_navlinks_s_\(28.6.2014.\)](https://books.google.hr/books?id=GJf3AgAAQBAJ&dq=sharma+theory+and+practice+third+edition&lr=&hl=hr&source=gbs_navlinks_s_(28.6.2014.))